

表观遗传学研究的模式生物 ——粗糙脉孢菌*

王亚军 何群**

(中国农业大学生物学院, 北京 100193)

摘要 丝状真菌粗糙脉孢菌是一种作为遗传学研究的经典模式生物。通过对粗糙脉孢菌 5S rRNA 基因的组成和在染色体上分布的研究, 揭示了丝状真菌中存在的一种基因组防御机制——重复序列诱导的 DNA 点突变(RIP)。通过对发生突变的 5S rRNA 假基因的研究还发现, 粗糙脉孢菌中存在一种重要的表观遗传修饰——DNA 甲基化, 随后的深入研究使粗糙脉孢菌成为解析 DNA 甲基化机制的最重要模式生物之一。粗糙脉孢菌基因转化操作引起的营养生长阶段同源基因的沉默(quelling)是由 RNAi 途径调控的, 同时该途径也是调控减数分裂过程中非配对 DNA 诱发的基因沉默(meiotic silencing)的关键。由于粗糙脉孢菌基因组简单, 且存在与高等真核生物相同的 DNA 甲基化和多种组蛋白的修饰, 使其成为今后深入研究组蛋白修饰与染色质重塑等表观遗传现象参与基因表达调控和基因组稳定性维持的重要模式生物之一。

关键词 粗糙脉孢菌, 重复序列诱导的 DNA 点突变, 基因沉默, DNA 甲基化

学科分类号 Q756

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0267

生物学家选择特定的物种作为模式生物来深入研究该物种的解剖、发育、生理、遗传和进化的机制已有非常悠久的历史了。通过对这一特定物种的研究所获得的结果可以归纳出适用于更大范围生物类群的一些普遍性规律。丝状真菌粗糙脉孢菌就是这样一种模式生物。1843 年粗糙脉孢菌作为法国面包店的污染生物出现在文献中^[1]。随后真菌学家 Cornelius L. Shear 和 Bernard O. Dodge 确定其分类地位并为其建立了子囊菌的一个新属——脉孢菌属 (*Neurospora*)^[2]。Dodge 早期所做的脉孢菌的杂交实验和子囊孢子热激萌发实验以及他所确定的两种生理交配型等开拓性工作, 奠定了研究粗糙脉孢菌所需的实验方法; 遗传学家 Carl C. Lindegren 利用分离到的形态学变异作为标记来进行遗传分析, 建立了粗糙脉孢菌的 5 个连锁群, 这些基础工作使得粗糙脉孢菌成为一种易于操作的实验物种^[1-2]。到 1939 年, 粗糙脉孢菌的线性子囊(含有 8 个子囊孢子)成为生物学教科书中展示减数分裂四分体连锁互换的实例^[2]。1941 年 George Beadle 和 Edward Tatum 利用物理诱变获得第一个参与生化代谢的粗

糙脉孢菌突变体, 基于他们的研究结果提出了“一个基因一个酶”假说^[3]。这些研究工作不但确定了粗糙脉孢菌作为模式生物的地位, 并使其在分子遗传学、生物化学、生理学和细胞学以及近年来在发育、光生物学、昼夜节律、基因沉默、DNA 甲基化、生态和进化等研究中发挥作用^[1-2]。

1 重复序列诱导的 DNA 点突变(RIP)

与其他物种的 5S rRNA 基因组成不同, 早期在研究粗糙脉孢菌基因组的 rDNA 结构时发现, 粗糙脉孢菌的 100 多个 5S rRNA 基因分散存在于基因组中^[3-5], 这些基因只有大约 150 bp 的序列相似性。这些特性暗示粗糙脉孢菌基因组的组成和维持具有独特之处。在这个时期进行的大量 DNA 转化实验还发现, 转基因菌株进行杂交后会引起载体携

* 国家自然科学基金(31171208)和教育部博士点基金(20110008110027)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62731206, E-mail: qunhe@cau.edu.cn

收稿日期: 2015-08-26, 接受日期: 2015-09-23

带的基因和基因组原位存在的基因都会发生突变^[6]. 这些现象让 Selker 等^[6]推测: 粗糙脉孢菌中存在能够探测受精过程中异核体状态下单倍体细胞核中存在的重复 DNA 序列的一种机制, 并将重复的 DNA 序列突变. Selker 和 Garrett^[7]设计了一系列精致的实验对转化子杂交的子代进行详细分析,

他们发现, 转化子在异位携带的 DNA 序列与原位序列的重复是杂交过程中引起重复序列发生突变的真正原因, 因此, 他们将这种现象定义为: 重复序列诱导的 DNA 点突变 (repeat-induced point mutation, RIP)(图 1).

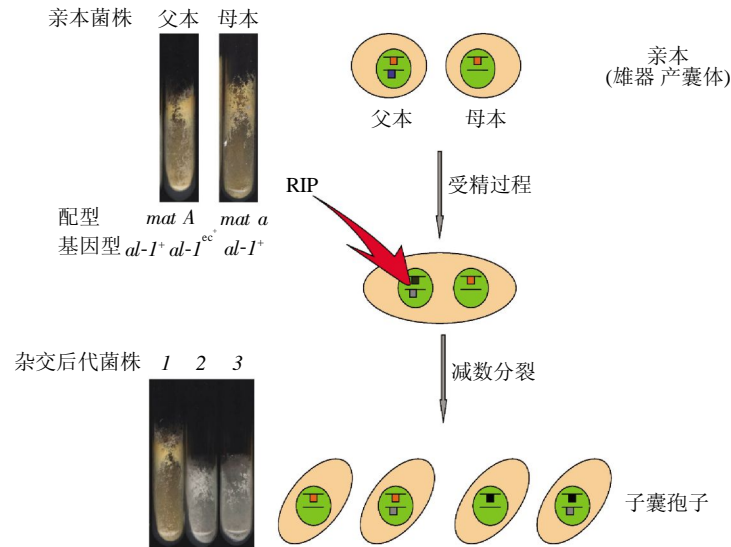


Fig. 1 Repeat-induced point mutation (RIP)

图 1 重复序列诱导的 DNA 点突变

为了便于说明, 图中只显示 7 条染色体中的 2 条(含有直线的绿色圆圈代表细胞核). 原位的白化基因 *al-1* (该基因可编码类胡萝卜素生物合成所需的酶)由橙色方框表示, 蓝色方框代表由转化操作所引入的该基因在另一条染色体上的重复序列(顶部左侧). 在亲本双方的配子进行杂交的过程中, RIP (由红色箭头表示)作用于重复的 *al-1* 基因. RIP 现象发生在受精和不同细胞核融合的过程之间. 遗传实验的结果显示, 在重复序列(由黑色及灰色方框表示)上会发生大量的由 C 到 T 的转换以及 DNA 甲基化修饰. 杂交产生的后代菌株中, 不同染色体以 4 种方式进行组合; 其中, *al-1* 基因完全被 RIP 沉默的后代, 菌丝呈现为白色(例如, 2、3 号菌株).

在粗糙脉孢菌的有性生殖阶段, 监测和调控 RIP 的机器能够识别大于 400 bp 的串联重复的 DNA 序列或大于 1 000 bp 未连锁的 DNA 重复序列^[8], 并引起重复序列上 C:G 碱基对突变成 T:A 碱基对. 在重复序列中最容易发生 RIP 的二核苷酸为 CpA, RIP 机器使得 CpA 转换成为 TpA, 从而使这些重复序列突变成富含 AT(AT-rich)的 DNA 片段^[9-10]. 遗传学分析显示, 在营养生长阶段粗糙脉孢菌基因组获得的重复 DNA 序列, 将在受精后的 DNA 复制和细胞核融合前的有性阶段被 RIP 机器识别并锁定, 从而引发后续突变的发生^[6].

在脉孢菌中, 由于 RIP 易于将 CpA 突变成 TpA, 这就非常容易在基因开放阅读框中引入终止密码子 TAA 和 TAG. 计算机模拟显示: 一个基因发生序列重复并经历一轮 RIP 后, 这个基因的每个拷贝都有 80% 的几率在读码框内获得至少一个终止密码子突变^[11]. 通过一轮 RIP, 就很有可能将重

复序列的基因或转座子突变成不能表达完整蛋白的基因^[11]. 基因组分析清楚地显示, 在粗糙脉孢菌中几乎没有有活性的转座子存在, 脉孢菌通过 RIP 来控制转座子跳跃引起的基因组不稳定, 因此, RIP 是最早发现的一种基因组防御机制^[12-13]. 由于弄清了引发 RIP 的准确原因, 研究者很快将 RIP 作为一种有效的方法用于粗糙脉孢菌突变体的构建. 由于简便易行, 通过 RIP 方法构建了很多粗糙脉孢菌基因的突变体, 这些突变体在解析基因功能中发挥了巨大作用.

解析 RIP 的分子机制是一项非常艰巨的挑战. Selker 实验室筛选到一个 RIP 缺陷的基因, 命名为 *rid*(RIP defective). *rid* 突变体表现出 RIP 的隐性缺陷. 尽管 RID 被预测为一个 DNA 甲基转移酶, 但 *rid* 突变体没有表现出营养生长时期的生长、发育和 DNA 甲基化的缺陷, 而且突变体能够进行有性生殖过程^[14]. 虽然对 RIP 的调控过程有些推测, 但

对于引发 RIP 的分子机器仍然知之甚少。

2 营养生长时期的基因沉默(quelling)

1990 年, Napoli 等^[15]为了获得开深颜色花的矮牵牛而构建了过表达查耳酮合成酶(chs)的转基因植株, 与他们的期望不同, 带有一个额外 *chs* 基因的植株与 *chs* 突变体一样只开白颜色的花. 1992 年, Romano 和 Macino^[16]在粗糙脉孢菌中观察到同样的现象. 当他们过表达类胡萝卜素合成的一个酶基因 (*albino-1*, *al-1*)时, 转化子中大约 30% 的克隆变成白化表型, 他们将这种营养生长过程中基因沉默的现象叫做 “quelling”. Macino 实验室不但发现和定义了 “quelling” 这种营养时期基因沉默的现象, 而且还通过系统的遗传分析确定了参与 quelling 过程的重要因子. 因此, Macino 实验室在解析基因沉默的分子机制中做了很多重要的开创性工作.

粗糙脉孢菌的转化子一般是异核体, 转入的基因(如 *al-1*)能够特异性地将自己和原位的基因沉默. RNA 印迹的结果显示没有剪接的 RNA 含量不受转基因的影响, 而该基因成熟的 mRNA 的量显著降低^[17], 暗示 quelling 引起的基因沉默是一种转录后的调控方式(post-transcriptional gene silencing),

而没有引起 *al-1* 基因的突变. 因此, 白化菌株的表型一般并不稳定, 分生孢子的颜色很容易恢复成浅黄色或橙色. 恢复的频率依据不同菌株而定^[16, 18].

为了解析参与 quelling 过程的重要因子, Macino 实验室选取一株稳定的白化菌株进行紫外线诱变, 获得了一些分生孢子变为橙色的突变体. 通过对这些突变体进行分析, 克隆了 3 个 quelling 缺陷(*qde*)的突变体: *qde-1*、*qde-2* 和 *qde-3*^[19]. *qde-1* 基因编码一个依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)^[20]; *qde-2* 基因编码一个 Argonaute 家族蛋白^[21]; *qde-3* 基因编码一个 RecQ DNA 解旋酶^[22]. 通过对这些基因功能的解析发现, 粗糙脉孢菌中的 quelling 同植物中的共抑制(co-suppression)或转录后基因沉默(PTGS)以及动物中的 RNA 干扰现象类似, 都是由 RNAi 途径介导的基因沉默过程. 在白化菌株的正向遗传筛选中没能筛选到产生小的双链 RNA 的重要因子 Dicer 酶. 粗糙脉孢菌的基因组编码 2 个 Dicer-Like 蛋白: DCL-1 和 DCL-2, 利用反向遗传学方法证实了它们也是粗糙脉孢菌 quelling 必需的重要因子^[23](图 2). Liu 实验室^[24]通过生化方法证实 QDE-2 的 RNA 剪切活性, 并发现一个与 QDE-2 相互作用的

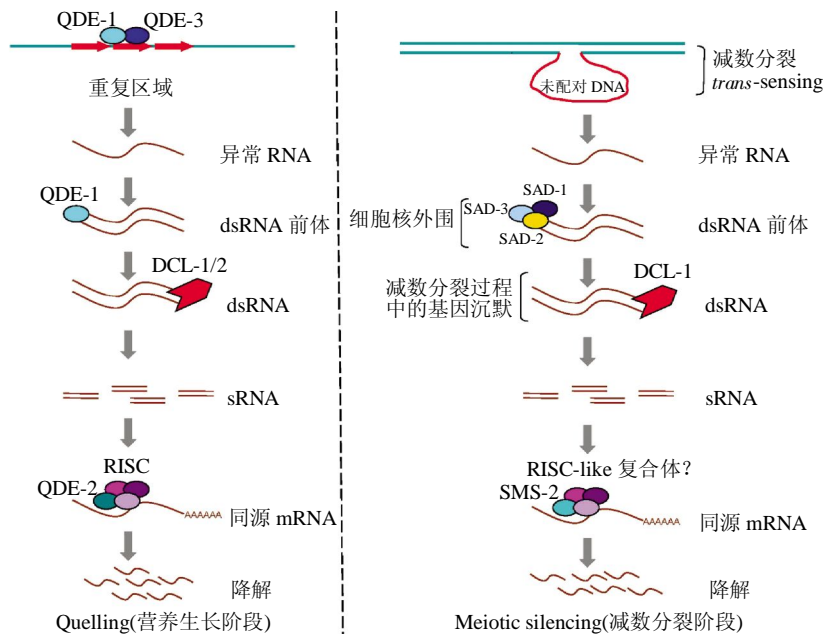


Fig. 2 Models for RNAi-related pathways in *Neurospora crassa*

图 2 粗糙脉孢菌中基于 RNAi 途径的沉默机制

在营养生长阶段(左), QDE-1 和 QDE-3 作用于重复基因区域从而生成单链异常 RNAs, 接着 QDE-1 将这些异常 RNAs 转换为 dsRNA 前体. dsRNA 在 DCLs 的作用下产生 sRNAs, sRNAs 进一步与含有 QDE-2 的 RISC 复合体结合, 最终造成基因沉默. 红色箭头表示基因重复区域. 在减数分裂阶段(右), 细胞可监测到未配对的 DNA 序列, 进而生成异常 RNAs. 在细胞核外围, SAD-1 在 SAD-2, SAD-3 的协同作用下将异常 RNAs 转换为 dsRNA. 接下来 DCL-1 将 dsRNA 切割为 sRNAs, sRNAs 进而与含有 SMS-2 的 RISC 复合体结合, 完成基因沉默. 缩写: RNAi: RNA interference; QDE: quelling-defective; dsRNA: double-stranded RNA; SAD-1/2/3: suppressor of ascus dominance 1/2/3; DCL: Dicer-like protein; sRNA: small noncoding RNA; RISC: RNA-induced silencing complex; SMS-2: suppressor of meiotic silencing-2.

蛋白 QIP(QDE-2-interacting protein)能够利用其核酸外切酶活性降解 siRNA 双链中的 passenger strand, 从而参与到 quelling 和 RNAi 过程中。

3 减数分裂过程中的基因沉默 (meiotic silencing)

减数分裂过程中最重要的事件是同源染色体配对及交叉互换。同源染色体配对需要将两条同源染色体的 DNA 排列成直线来比较它们序列的相似性, 然而对于减数分裂过程中如何感应同源染色体上未配对的 DNA 片段的机制了解甚少。在同源重组发生前该机制能够区分出两个亲本同源染色体上基因组的差异程度, 细胞依据基因组差异程度的大小来决定哪些信号途径被激活^[25]。

粗糙脉孢菌减数分裂过程中的基因沉默最初被称为“未配对的 DNA 引发的减数分裂过程中的基因沉默”(meiotic silencing by unpaired DNA, MSUD)^[25-28]。顾名思义这类基因沉默只发生在减数分裂过程中。Aramayo 等^[27]在研究 *Ascospore maturation-1*(*Asm-1*)缺失突变体的功能时发现, 在减数分裂时期细胞感受不能配对的 DNA, 并将其沉默。粗糙脉孢菌减数分裂过程中未配对的 DNA 引发的基因沉默, 是通过遗传分析揭示出来的一个表观遗传修饰调控基因表达的精彩范例。

ASM-1 作为转录因子参与调控子囊孢子成熟相关基因的表达^[26-27]。在营养生长阶段, *Asm-1* 缺失突变体不能形成气生菌丝和原子囊壳^[26-27]。*Asm-1* 功能丧失的突变体表现出隐性性状, 即遗传了该突变等位基因的子囊孢子不能发育(在子囊中显现为 4 个白色的子囊孢子); 相反, 遗传了 *Asm-1*⁺ 等位基因的子囊孢子能够正常成熟(在子囊中显现为 4 个黑色的子囊孢子)。1 个 *Asm-1* 缺失等位基因(*Asm-1*^Δ)却表现为子囊显性遗传性状, 即当与一个 *Asm-1*⁺ 等位基因的亲本杂交后子囊中的所有孢子都不能发育(在子囊中显现为 8 个白色的子囊孢子)。异位表达 *Asm-1*⁺ 基因能够将缺失突变体(*Asm-1*^Δ)的营养生长阶段的缺陷补救(如气生菌丝和子囊壳形成等), 但却不能补救有性时期的表型缺陷——子囊孢子成熟的缺陷, 说明转化子形成杂合菌株(*Asm-1*^Δ; *Asm-1*⁺)的子囊孢子成熟缺陷与单倍剂量不足无关而是另有原因^[26]。

在减数分裂早期, 染色体能够感知同源染色体上同源序列的存在。如果这个区域的相似程度在一定阈值范围内细胞就能正常发育, 否则, 减数分裂

的感应机器就被激活来检测基因组中不能够配对的区域^[25], 进而沉默该基因。上述杂合菌株基因型导致的子囊孢子成熟缺陷不能被补救的主要原因, 很可能是在减数分裂过程中该亲本原位的 *Asm-1*^Δ 不能与另一个亲本的 *Asm-1*⁺ 配对, 而其异位转化的 *Asm-1*⁺ 基因, 在另一个亲本相同染色体位置上也找不到与之配对的 DNA 序列从而引发 *Asm-1*⁺ 基因沉默, 导致子囊孢子不能发育。Aramayo 和 Metzberg^[26]用 *Asm-1*^Δ(原位)::*Asm-1*⁺(异位)菌株和 *Asm-1*^Δ(原位)::*Asm-1*⁺(异位)菌株进行杂交, 发现两个亲本相同异位携带的 *Asm-1*⁺ 等位基因将原位 *Asm-1* 缺失菌株的子囊显性突变表型补救回来, 即将子囊中原来的 8 个白色孢子补救成全部黑色孢子。这个结果说明: 在异位能够配对的 *Asm-1*⁺ 在减数分裂过程中没有被沉默还能够行使功能。如果 *Asm-1*⁺ 沉默确实是由减数分裂过程中未配对 DNA 引起的, 那么两个亲本的原位都是 *Asm-1*⁺ 而其中一个亲本再异位转化一个 *Asm-1*⁺, 在减数分裂过程中这个异位的 *Asm-1*⁺ 由于在另一个亲本相同染色体位置找不到与之配对的 DNA 序列也会引起 *Asm-1*⁺ 沉默, 所以这组杂交的子囊中, 8 个子囊孢子都是未成熟的白色孢子。这些结果证实粗糙脉孢菌减数分裂过程中不能配对的等位基因引发了所有 *Asm-1*⁺ 基因(配对的和未配对的)的沉默^[26]。

Shiu 等^[28]在解析减数分裂过程中基因沉默的分子机制时发现: 粗糙脉孢菌的一个半显性突变体 *Sad-1* 能够抑制 *Asm-1*^Δ 引起的子囊显性表型, 即“未配对 DNA 引发的减数分裂过程中基因沉默”。*Sad-1* 基因编码一个依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, 暗示 RNAi 相关途径参与到减数分裂中的基因沉默调控。随后一系列遗传实验证实了上述的推测(图 2)。

4 粗糙脉孢菌是研究真核生物 DNA 甲基化的一个简单模型

真核生物的 DNA 甲基化修饰发生在胞嘧啶的第 5 位碳原子上。DNA 甲基化修饰对动植物的生命活动十分重要, 与多种生物学过程息息相关, 包括基因与转座子的沉默、基因组印记、X 染色体失活等。

早期在研究粗糙脉孢菌基因组中的 5S rRNA 基因时, 科学家们克隆了一些 5S rRNA 的基因。其中在分析一个 1.6 kb 的 ζ - η DNA 片段时, Selker 和 Stevens^[29]发现它是由 2 个 5S rRNA 基因的串联

重复形成的。限制性内切酶分析发现在这个 DNA 片段的重复区域存在大量的胞嘧啶的甲基化修饰。粗糙脉孢菌中第二个 DNA 甲基化区域 $\psi 63$ 也是一个 5S rRNA 的假基因^[30]。

粗糙脉孢菌有 7 条染色体，DNA 甲基化修饰发生在着丝粒旁区、端粒区以及 RIP 之后的遗迹序列上。在粗糙脉孢菌的基因组中大约 1.5% 的胞嘧啶被甲基化修饰，而在其他模式生物如线虫、芽殖酵母和裂殖酵母中都没有检测到 DNA 甲基化。这就使得粗糙脉孢菌成为解析真核生物 DNA 甲基化调控机制最简单的模式生物。Selker 实验室经过多年系统的遗传学分析发现调控粗糙脉孢菌从头甲基化和维持甲基化的 DNA 甲基转移酶只有一个——DIM-2(defective in methylation 2)^[31]。DIM-2 含有保守的 DNMT 结构域负责 DNA 甲基化的建成和维持。尽管粗糙脉孢菌的另一个蛋白 RID 也含有 DNMT 结构域，但它却不参与任何 DNA 甲基化的修饰过程^[14]。

粗糙脉孢菌 DNA 的甲基化多发生在由 RIP 过程引起的 AT-rich 区域中。Miao 等^[32]通过实验证实：富含 AT 的 DNA 序列信息能够引发临近 DNA 序列上从头甲基化修饰的发生，因此，他们推测可能有一类蛋白能特异识别这段 AT-rich 的 DNA 区域并招募 DNA 甲基转移酶 DIM-2。但是目前仍未发现识别富含 AT 序列信号的蛋白，并且 RNAi 途径并不参与粗糙脉孢菌 DNA 甲基化的调控过程。Selker 实验室首先确定组蛋白 H3K9 的三甲甲基化修饰也是粗糙脉孢菌 DNA 甲基化的重要调控步骤^[33]，这种保守的机制很快在植物和哺乳动物中得到证实^[34-35]。粗糙脉孢菌基因组上的 DNA 甲基化信号被识别后，组蛋白甲基转移酶 DIM-5 被募集到该区域，并对组蛋白 H3K9 进行三甲甲基化修饰，异染色质蛋白 HP1 识别三甲甲基化修饰的 H3K9 而结合到染色质上，由 HP1 募集 DNA 甲基转移酶 DIM-2 到基因组上对胞嘧啶进行甲基化修饰^[36]。DIM-5 还需要与基于 Cul4 的泛素连接酶形成复合体来调控组蛋白 H3K9 三甲甲基化修饰及指导 DNA 甲基化过程^[37-39]。

由于粗糙脉孢菌具有很强的 RIP 机制，参与粗糙脉孢菌 DNA 甲基化调控的关键蛋白在基因组中都是由一个基因编码的，不存在基因冗余，因此，失活一个基因就能检测到粗糙脉孢菌 DNA 甲基化的丧失。同时，RNAi 途径又不参与粗糙脉孢菌 DNA 甲基化的调控，因此，与高等动植物相比，

粗糙脉孢菌是研究真核生物 DNA 甲基化的一个最简单模型。通过解析该物种中 DNA 甲基化的调控机制与功能，将为其他物种中的相关研究提供重要的参考。

5 展 望

在过去几十年中，粗糙脉孢菌在解析真核生物 DNA 甲基化、RNAi 引起的基因沉默、基因组稳定性维持等表观遗传修饰的研究中发挥了重要作用，成为研究表观修饰的重要模式生物。

由于 RIP 机制的存在，粗糙脉孢菌基因组中绝大多数基因都是单拷贝，这使得利用粗糙脉孢菌研究生物学问题变得简单化。最近，粗糙脉孢菌突变体库也构建完成，这为深入研究组蛋白修饰与染色质重塑等表观遗传现象参与的基因表达调控和基因组稳定性的维持提供了极大的便利。

参 考 文 献

- [1] Borkovich K A, Alex L A, Yarden O, *et al.* Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, **68**(1): 1-108
- [2] Davis R H, Perkins D D. *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Reviews Genetics*, 2002, **3**(5): 397-403
- [3] Free S J, Rice P W, Metzberg R L. Arrangement of the genes coding for ribosomal ribonucleic acids in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 1979, **137**(3): 1219-1226
- [4] Metzberg R L, Stevens J N, Selker E U, *et al.* Identification and chromosomal distribution of 5S rRNA genes in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**(7): 2067-2071
- [5] Selker E U, Yanofsky C, Driftmier K, *et al.* Dispersed 5S RNA genes in *N. crassa*: structure, expression and evolution. *Cell*, 1981, **24**(3): 819-828
- [6] Selker E U. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annual Review of Genetics*, 1990, **24**(1): 579-613
- [7] Selker E U, Garrett P W. DNA sequence duplications trigger gene inactivation in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(18): 6870-6874
- [8] Watters M K, Randall T A, Margolin B S, *et al.* Action of repeat-induced point mutation on both strands of a duplex and on tandem duplications of various sizes in *Neurospora*. *Genetics*, 1999, **153**(2): 705-714
- [9] Cambareri E B, Jensen B C, Schabtach E, *et al.* Repeat-induced GC to AT mutations in *Neurospora*. *Science*, 1989, **244**(4912): 1571-1575
- [10] Grayburn W S, Selker E U. A natural case of RIP: degeneration of the DNA sequence in an ancestral tandem duplication. *Molecular and Cellular Biology*, 1989, **9**(10): 4416-4421

- [11] Galagan J E, Calvo S E, Borkovich K A, *et al.* The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 2003, **422**(6934): 859–868
- [12] Galagan J E, Selker E U. RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends in Genetics*, 2004, **20**(9): 417–423
- [13] Aramayo R, Selker E U. *Neurospora crassa*, a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, **5**(10): a017921
- [14] Freitag M, Williams R L, Kothe G O, *et al.* A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(13): 8802–8807
- [15] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 1990, **2**(4): 279–289
- [16] Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 1992, **6** (22): 3343–3353
- [17] Cogoni C, Irelan J T, Schumacher M, *et al.* Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO Journal*, 1996, **15**: 3153–3163
- [18] Cogoni C, Macino G. Conservation of transgene-induced post-transcriptional gene silencing in plants and fungi. *Trends in Plant Science*, 1997, **2**(11): 438–443
- [19] Cogoni C, Macino G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(19): 10233–10238
- [20] Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 1999, **399**(6732): 166–169
- [21] Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, *et al.* Transcription: Gene silencing in worms and fungi. *Nature*, 2000, **404**(6775): 245–245
- [22] Cogoni C, Macino G. Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science*, 1999, **286**(5448): 2342–2344
- [23] Catalanotto C, Pallotta M, ReFalo P, *et al.* Redundancy of the two *dicer* genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, **24**(6): 2536–2545
- [24] Maiti M, Lee H-C, Liu Y. QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora Argonaute* protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes & Development*, 2007, **21**(5): 590–600
- [25] Kelly W G, Aramayo R. Meiotic silencing and the epigenetics of sex. *Chromosome Research*, 2007, **15**(5): 633–651
- [26] Aramayo R, Metzberg R L. Meiotic transvection in fungi. *Cell*, 1996, **86**(1): 103–113
- [27] Aramayo R, Peleg Y, Addison R, *et al.* *Asm-1+*, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics*, 1996, **144**(3): 991–1003
- [28] Shiu P K, Metzberg R L. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell*, 2001, **107**(7): 905–916
- [29] Selker E U, Stevens J N. DNA methylation at asymmetric sites is associated with numerous transition mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**(23): 8114–8118
- [30] Margolin B S, Garrett-Engle P W, Stevens J N, *et al.* A methylated *Neurospora* 5S rRNA pseudogene contains a transposable element inactivated by repeat-induced point mutation. *Genetics*, 1998, **149**(4): 1787–1797
- [31] Kouzminova E, Selker E U. *dim-2* encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *The EMBO Journal*, 2001, **20**(15): 4309–4323
- [32] Miao V P, Freitag M, Selker E U. Short TpA-rich segments of the ζ - η region induce DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Journal of Molecular Biology*, 2000, **300**(2): 249–273
- [33] Tamaru H, Selker E U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, 2001, **414**(6861): 277–283
- [34] Jackson J P, Lindroth A M, Cao X, *et al.* Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, **416**(6880): 556–560
- [35] Lehnertz B, Ueda Y, Derijck A A, *et al.* Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology*, 2003, **13**(14): 1192–1200
- [36] Honda S, Selker E U. Direct interaction between DNA methyltransferase DIM-2 and HP1 is required for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, **28**(19): 6044–6055
- [37] Lewis Z A, Adhvaryu K K, Honda S, *et al.* DNA methylation and normal chromosome behavior in *Neurospora* depend on five components of a histone methyltransferase complex, DCDC. *PLoS Genet*, 2010, **6**(11): e1001196–e1001196
- [38] Zhao Y, Shen Y, Yang S, *et al.* Ubiquitin ligase components Cullin4 and DDB1 are essential for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(7): 4355–4365
- [39] Xu H, Wang J, Hu Q, *et al.* DCAF26, an adaptor protein of Cul4-based E3, is essential for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet*, 2010, **6**(9): e1001132

A Model Organism for Epigenetics Study: *Neurospora crassa**

WANG Ya-Jun, HE Qun**

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The filamentous fungus *Neurospora crassa* is a global model for genetic research. The analyses of its 5S RNA genes' composition and distribution across the genome revealed the genomic defense system RIP (repeat-induced point mutation). And by analyzing its mutated 5S RNA pseudogenes, one important epigenetic modification, DNA methylation, was identified. Subsequent research made *Neurospora crassa* as one of the most extensive model organisms for investigation the mechanism of DNA methylation among the eukaryotes. During its vegetative growth stage, the homologous genes silencing (quelling) caused by transgene was demonstrated to be regulated by RNA interference which was exhibited to play a key role in meiotic silencing. The features of *Neurospora crassa* including its streamlined genome and the same DNA methylation and histone modifications as the higher eukaryotes will make it an important model organism to further research the epigenetic regulation of gene expression and genome stability.

Key words *Neurospora*, repeat-induced point mutation, quelling, DNA methylation, meiotic silencing

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0267

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31171208) and Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20110008110027).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62731206, E-mail: qunhe@cau.edu.cn

Received: August 26, 2015 Accepted: September 23, 2015